



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|--|-----------|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/86, 15/33, 15/52 C12N 7/01 // (C12N 7/01 C12R 1/92) | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 92/01801 (43) Date de publication internationale: 6 février 1992 (06.02.92) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00588 (22) Date de dépôt international: 17 juillet 1991 (17.07.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/09143 18 juillet 1990 (18.07.90) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : DEVAUCHELLE, Gérard [FR/FR]; 137, chemin de l'Espervette, F-30380 Saint-Christol-lès-Alès (FR). CERUTTI, Martine [FR/FR]; 2997, route de Montèze, F-30380 Saint-Christol-lès-Alès (FR). CAHOREAU, Claire [FR/FR]; 16, rue Pierre-Semard, F-30100 Nîmes (FR). MARTIN, Marianne [FR/FR]; 15 bis, chemin de l'Escalette, Domaine de l'Escalette, F-30700 Uzès (FR). | | (74) Mandataires: ORES, Bernard etc. ; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), BG, CA, CH (brevet européen), CS, DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FI, FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), HU, IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), NO, PL, SE + (brevet européen), SU, US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> |
| (54) Title: MODIFIED BACULOVIRUS, METHOD FOR OBTAINING IT, AND EXPRESSION VECTORS OBTAINED FROM SAID BACULOVIRUS (54) Titre: BACULOVIRUS MODIFIÉE, SON PROCÉDE D'OBTENTION, ET VECTEURS D'EXPRESSION OBTENUS A PARTIR DUDIT BACULOVIRUS (57) Abstract <p>The invention relates to a modified baculovirus wherein one of the two strong late promoters of the wild baculovirus is inactive, as well as to a method for obtaining such a modified baculovirus and to its application for obtaining vectors for the expression of exogenous genes. Said modified baculovirus is particularly deprived of the polyhedrin gene promoter and contains the protein P10 gene promoter.</p> (57) Abrégé <p>L'invention est relative à un baculovirus modifié, dans lequel l'un des deux promoteurs tardifs forts du baculovirus sauvage est inactif, ainsi qu'à un procédé pour l'obtention d'un tel baculovirus modifié et à son application pour l'obtention de vecteurs d'expression de gènes exogènes. Ledit baculovirus modifié est notamment dépourvu du promoteur du gène de la polyédrine et contient le promoteur du gène de la protéine P10.</p> | | |

+ DESIGNATIONS DE "SU"

On ignore encore pour quels Etats de l'ancienne Union soviétique une désignation de l'Union soviétique déploie ses effets.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|-----------------|-----------------------|
| AT | Autriche | ES | Espagne | MG | Madagascar |
| AU | Australie | FI | Finlande | ML | Mali |
| BB | Barbade | FR | France | MN | Mongolie |
| BE | Belgique | GA | Gabon | MR | Mauritanie |
| BF | Burkina Faso | GB | Royaume-Uni | MW | Malawi |
| BG | Bulgarie | GN | Guinée | NL | Pays-Bas |
| BJ | Bénin | GR | Grèce | NO | Norvège |
| BR | Brésil | HU | Hongrie | PL | Pologne |
| CA | Canada | IT | Italie | RO | Roumanie |
| CF | République Centrafricaine | JP | Japon | SD | Soudan |
| CG | Congo | KP | République populaire démocratique de Corée | SE | Suède |
| CH | Suisse | | | SN | Sénégal |
| CI | Côte d'Ivoire | KR | République de Corée | SU ⁺ | Union soviétique |
| CM | Cameroun | LI | Liechtenstein | TD | Tchad |
| CS | Tchécoslovaquie | LK | Sri Lanka | TG | Togo |
| DE | Allemagne | LU | Luxembourg | US | Etats-Unis d'Amérique |
| DK | Danemark | MC | Monaco | | |

BACULOVIRUS MODIFIE, SON PROCEDE D'OBTENTION, ET VECTEURS D'EXPRESSION OBTENUS A PARTIR DUDIT BACULOVIRUS

La présente Invention est relative à des vecteurs d'expression obtenus à partir de baculovirus modifiés, dans lesquels l'un des deux promoteurs tardifs forts du baculovirus sauvage est inactif.

Les baculovirus sont actuellement utilisés dans de très nombreux laboratoires comme vecteurs d'expression de gènes. En effet, ces virus possèdent les avantages suivants : ils permettent l'insertion de longs segments d'ADN et possèdent en outre deux promoteurs tardifs forts, le promoteur de la polyédrine, et le promoteur de la protéine P10, qui sont capables d'induire un niveau d'expression extrêmement élevé des gènes placés sous leur contrôle.

La publication de L.K. MILLER [CHAPITRE 14 "A VIRUS VECTOR FOR GENETIC ENGINEERING IN INVERTEBRATES" du Manuel "GENETIC ENGINEERING IN THE PLANTS SCIENCES" (1981) N.J. PANAPOULOS, ed., Praeger Pub. New York, p. 203-224] décrit les avantages de l'utilisation des baculovirus, et en particulier du baculovirus *Autographa californica* (AcNPV), comme vecteurs d'expression de gènes étrangers dans des cellules-hôtes d'insectes. Le baculovirus AcNPV décrit dans cette publication possède deux formes matures respectivement appelées forme non occlusive (NOV) et forme occlusive (OV). Les formes non occlusives sont responsables de la transmission du virus en culture cellulaire ou à l'intérieur d'un même organisme. Les formes occlusives sont responsables de la transmission du virus d'un organisme à un autre. Ces formes occlusives sont constituées de virions enveloppés dans une matrice protéique cristalline essentiellement constituée d'une seule protéine : la polyédrine.

Il a été démontré que le gène de la polyédrine possédait un promoteur exceptionnellement fort qui permettait d'assurer un niveau d'expression élevé du gène placé sous son contrôle. MILLER signale donc qu'il serait particulièrement avantageux d'utiliser les baculovirus

comme vecteurs d'expression, en insérant sous contrôle du promoteur de la polyédrine l'ADN exogène que l'on désire exprimer.

D'autres travaux [SMITH et SUMMERS., J.Virol. 45, 215-225 (1983)] ont montré que le virus AcNPV possédait un autre promoteur tardif fort, qui est le promoteur du polypeptide 10kDa, ou protéine P10.

En outre la capside des baculovirus peut contenir de grandes quantités d'ADN et ne constitue donc pas une limite au nombre ou à la longueur des gènes insérés. En conséquence, de très nombreux vecteurs d'expression dérivés des baculovirus ont été proposés. Par exemple, la Demande de Brevet Européen 127 839, (Invention SUMMERS), décrit un procédé permettant la production d'un vecteur d'expression recombinant, issu de baculovirus, en passant par l'intermédiaire d'un vecteur de transfert renfermant un fragment d'ADN viral qui contient le promoteur du gène de la polyédrine, en aval duquel est inséré le gène étranger. Ce vecteur de transfert est ensuite recombiné avec l'ADN du baculovirus sauvage et les recombinants possédant le gène étranger sous contrôle du promoteur de la polyédrine sont sélectionnés.

La Demande de Brevet Européen 340 359 (Inventeurs PAGE et RODGERS) décrit des vecteurs de transfert dérivés des baculovirus, dans lesquels le codon d'initiation ATG de la polyédrine est supprimé, de façon à ce que la séquence codant pour la polyédrine ne puisse pas être traduite, et qui portent un site de restriction convenant à l'insertion d'un gène exogène en aval de l'extrémité N-terminale du gène de la polyédrine, et à proximité immédiate de ladite extrémité.

L'équipe des Inventeurs a précédemment mis au point un procédé de production d'un baculovirus modifié, utilisable comme vecteur d'expression, dans lequel on insère directement et sans recourir à un vecteur de

transfert, un site de restriction approprié, en aval d'un promoteur tardif fort. Le vecteur ainsi obtenu peut être chargé, à l'emplacement du site de restriction introduit, avec le gène que l'on désire faire exprimer ; ce procédé
5 fait l'objet de la Demande de Brevet Européen 345 152.

Dans tous les procédés connus, le gène à exprimer est inséré sous le contrôle de l'un des deux promoteurs tardifs forts présents dans le génome du baculovirus sauvage, tandis que l'autre promoteur continue à
10 fonctionner normalement.

Certaines constructions dérivées de baculovirus par inactivation d'un promoteur tardif fort sont connues dans l'art antérieur ; RANKIN et al. [GENE, 70, 39-49 (1988)] décrivent différentes mutations du
15 promoteur de la polyédrine ayant pour effet d'inhiber à des degrés variés, l'expression d'un gène placé sous contrôle dudit promoteur. IATROU et al. [GENE, 75, 59-71 (1989)] décrivent l'obtention de baculovirus dans lequel le promoteur de la polyédrine a été inactivé par
20 délétion. Ils proposent l'utilisation de ces baculovirus comme vecteurs de transfert, pour l'obtention de constructions dans lesquelles on souhaite placer un gène exogène sous le contrôle de son propre promoteur, et non sous celui du promoteur de la polyédrine.

Des constructions dans lesquelles le promoteur de la protéine P10 est inactif ont également été réalisées ; QUIN et al. [J. Gen. Virol. 70, 1273-1280 (1989)] décrivent ainsi des plasmides recombinants
25 comprenant des constructions dans lesquelles un gène exogène est placé sous le contrôle de différents mutants du promoteur de la P10. Certaines de ces mutations ont pour effet l'inactivation totale du promoteur.
30

Toutefois, ces constructions n'ont été réalisées que sur des plasmides recombinants. En effet,
35 le promoteur du gène de la P10 recouvre une partie de la séquence codant pour la protéine P26, et il est

généralement considéré qu'une mutation dans ce promoteur ne permet pas d'obtenir de baculovirus viables.

D'autre part, il a été proposé, pour augmenter l'expression de gènes dans des vecteurs d'expression
5 dérivés de baculovirus, de multiplier, dans un même vecteur, le nombre de copies du gène et le nombre de promoteurs. Par exemple, la Demande de Brevet Européen 0 127 839 suggère d'insérer dans un même baculovirus des copies d'un gène sous contrôle du promoteur de la
10 polyédrine, d'autres copies sous contrôle du promoteur de la P10, et éventuellement, encore d'autres copies à d'autres emplacements du génome, chaque copie dudit gène étant sous contrôle d'un promoteur de baculovirus, ou bien de son propre promoteur.

15 Or, les Inventeurs ont découvert, de manière inattendue, que la suppression ou l'inactivation de l'un des deux promoteurs tardifs forts du baculovirus sauvage avait pour conséquence d'augmenter l'expression du gène placé sous le contrôle du promoteur restant.

20 La présente invention a pour but de pourvoir à de nouveaux vecteurs d'expression, construits à partir de baculovirus modifiés, et dans lesquels un seul des deux promoteurs tardifs présents dans le baculovirus sauvage est actif.

25 La présente invention a pour objet des vecteurs d'expression, caractérisés en ce qu'il sont obtenus à partir d'un baculovirus modifié dans lequel un des deux promoteurs tardifs forts présents dans le génome du baculovirus sauvage est inactif, et en ce que la
30 séquence placée sous le contrôle du promoteur tardif fort actif dans ledit baculovirus modifié est différente de la séquence correspondante du baculovirus sauvage.

Au sens de la présente Invention, "séquence différente de la séquence correspondante du baculovirus
35 sauvage" signifie en particulier que la séquence qui, chez le baculovirus sauvage, est contrôlée par le

promoteur considéré, a fait l'objet de modifications visant à permettre l'expression d'un gène exogène sous contrôle dudit promoteur. De telles modifications comprennent par exemple l'insertion d'une séquence
5 exogène (gène que l'on désire faire exprimer, séquence portant un ou plusieurs sites de restriction, etc ...) dans ladite séquence du baculovirus sauvage, ou à la place de tout ou partie de celle-ci.

Selon un mode de réalisation préféré d'un
10 vecteur d'expression conforme à l'Invention, le promoteur inactif est celui du gène de la polyédrine et le promoteur actif est celui du gène de la protéine P10.

Selon un autre mode de réalisation préféré d'un vecteur d'expression conforme à l'Invention, le
15 promoteur inactif est celui du gène de la protéine P10, et le promoteur actif est celui du gène de la polyédrine.

L'Invention a également pour objet des baculovirus modifiés utilisables pour l'obtention de vecteurs d'expression tels que définis plus haut.

20 Dans ce cadre, l'Invention englobe les baculovirus modifiés, infectieux, et dans lesquels le promoteur du gène de la protéine P10 est inactif.

Chez les baculovirus AcNPV (Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus), et GmNPV
25 (Galleria mellonella Nuclear Polyhedrosis Virus), le gène du polypeptide P10, qui est situé dans le fragment de restriction EcoRI P, est encadré en 5', par un gène codant pour un polypeptide dénommé P26, et dans la région 3', par un gène codant pour un polypeptide dénommé P74.
30 Le promoteur du gène de P10 se trouve à l'extrémité 3' du gène de P26, dans la région codante de ce dernier.

Les Inventeurs ont procédé à la délétion de la région comprise entre un site XhoI (position +569 du gène P26) et un site BglIII (position +152 du gène P10), puis
35 ont reliqué ces sites, après réparation par l'enzyme de Klenow. La région correspondant au promoteur et à

l'extrémité 5' de P10 est ainsi délétée. Un gène chimérique constitué des 569 premières bases de P26 et des 130 dernières bases de P10 est obtenu ; ce gène est fonctionnel, et les baculovirus modifiés de la sorte sont
5 parfaitement viables et produisent plus de polyédrine que le virus sauvage.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente Invention, le génome dudit baculovirus modifié est dépourvu d'une séquence d'ADN comprise entre le site
10 XhoI situé à +569pb du codon d'initiation ATG de la séquence codant pour le polypeptide P26 et le site BglII, situé à +152pb du codon d'initiation ATG de la séquence codant pour le polypeptide P10.

L'Invention englobe également les baculovirus
15 suivants, dans lesquels le promoteur du gène de la polyédrine est inactif :

- un baculovirus modifié dont le génome est dépourvu d'une séquence d'ADN comprise entre le site EcoRV situé à -95 pb et le site SspI situé à +910 pb du
20 codon d'initiation ATG de la séquence de la polyédrine.

- un baculovirus modifié dont le génome est dépourvu d'une séquence d'ADN comprise entre le site EcoRV situé à -95 pb et le site KpnI situé à +633 pb du
codon d'initiation ATG de la séquence de la polyédrine.

- un baculovirus modifié dont le génome est dépourvu d'une séquence d'ADN comprise entre le site EcoRV situé à -95 pb et le site Eco47III situé à +733 pb
25 du codon d'initiation ATG de la séquence codant pour la polyédrine.

30 Les Inventeurs ont constaté que les baculovirus ainsi modifiés se multiplient bien en culture cellulaire, et ne produisent plus la protéine dont le promoteur est inactivé, mais en revanche, synthétisent en plus grande quantité que le baculovirus sauvage, celle
35 dont le promoteur est actif.

Selon un autre mode de réalisation préféré de

la présente invention, les baculovirus modifiés contiennent une séquence marqueur, placée sous le contrôle du promoteur actif.

Au sens de la présente Invention, on entend
5 par "séquence marqueur" une séquence dont l'expression confère au baculovirus modifié un phénotype aisément identifiable. L'insertion ultérieure d'une séquence exogène à l'intérieur de ladite séquence entraîne l'annulation dudit phénotype, ce qui permet la sélection
10 des baculovirus ayant intégré ladite séquence exogène.

Selon une disposition particulièrement avantageuse de ce mode de réalisation, la séquence marqueur est constituée par la séquence codant pour la polyédrine, laquelle séquence est placée sous le contrôle du promoteur du gène de la protéine P10. Les baculovirus modifiés
15 obtenus de la sorte recouvrent leur capacité à produire des inclusions. Une souche de baculovirus obtenue conformément à cette disposition a été déposée, en date du 17 Juillet 1990, auprès de la Collection Nationale de
20 Microorganismes, tenue par l'Institut Pasteur à Paris. Cette souche porte le numéro de dépôt I-978.

Selon une autre disposition particulièrement avantageuse de ce mode de réalisation, le baculovirus modifié contient la séquence codant pour la
25 β -galactosidase, placée sous le contrôle du promoteur actif (protéine P10 ou polyédrine). Les baculovirus modifiés de la sorte ont la propriété de former des plages virales bleues en présence du substrat X-gal.

L'utilisation de baculovirus obtenus
30 conformément à l'une des deux dispositions qui précèdent permet, lors de l'insertion ultérieure d'un gène étranger, de sélectionner aisément les virus recombinants ayant intégré ledit gène étranger à l'intérieur du gène de la polyédrine ou de celui de la β -galactosidase. En
35 effet, dans le premier cas, lesdits virus recombinants ne forment plus de polyèdres ; dans le deuxième cas, ils

forment des plages blanches, au lieu des plages bleues.

Pour obtenir des baculovirus modifiés utilisables pour l'obtention des vecteurs d'expression conformes à l'Invention, l'on procède à l'inactivation, 5 par tous moyens appropriés, de l'un des promoteurs tardifs forts présents dans le génome du baculovirus sauvage.

L'on procède par exemple de la sorte à l'inactivation du promoteur de la polyédrine, ou du 10 promoteur de la protéine P10 par excision d'un fragment d'ADN comprenant ledit promoteur.

L'excision dudit fragment d'ADN peut être effectuée à l'aide d'enzymes de restriction.

Il va de soi que d'autres procédés, comme par 15 exemple, des procédés classiques faisant appel à des techniques de recombinaison homologue, peuvent être utilisés pour procéder à l'excision du fragment d'ADN désiré.

L'inactivation de l'un ou l'autre des deux 20 promoteurs peut également être effectuée par mutagenèse de séquences participant à l'activité dudit promoteur, par exemple comme décrit dans la publication de RAKIN et al. précitée.

Des vecteurs d'expression chargés conformes à 25 l'Invention, peuvent être obtenus à partir des baculovirus modifiés, par divers procédés connus en eux-mêmes, par exemple, et de façon non limitative, en utilisant des vecteurs de transfert, tels que ceux décrits dans les Demandes de Brevet Européen 127 839 et 30 340 359, ou bien par insertion directe, comme décrit dans la Demande de Brevet Européen 345 152).

La séquence codant pour la protéine exogène que l'on désire faire exprimer est insérée sous contrôle du promoteur actif ; la séquence qui, chez le baculovirus 35 sauvage est normalement placée sous contrôle dudit promoteur, peut être totalement ou partiellement excisée,

et remplacée par la séquence codant pour la protéine exogène.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de construction des baculovirus modifiés et des vecteurs d'expression conformes à l'invention. Il va toutefois de soi que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de la présente invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Construction d'un baculovirus modifié dépourvu du promoteur et du gène de structure de la polyédrine

Les protocoles utilisées dans cet exemple et les suivants font appel à des techniques classiques du génie génétique, telles que celles décrites par MANIATIS et al. [Molecular cloning : A Laboratory Manual ; Cold Spring Harbor Laboratory, 1982]. Les conditions particulières à chaque expérimentation sont, s'il y a lieu, précisées dans l'exemple correspondant.

Des baculovirus modifiés conformes à l'Invention sont obtenus par digestion partielle de l'ADN du baculovirus sauvage par deux enzymes de restriction, dont les sites de coupure se situent pour l'une d'entre elles, en amont du promoteur de la polyédrine, et pour l'autre, en aval dudit promoteur, soit dans la séquence codant pour la polyédrine, soit en aval de ladite séquence.

L'ADN génomique total d'un baculovirus appartenant à la souche *Autographa californica* est coupé successivement par les enzymes EcoRV et Eco47III suivant la technique de digestion partielle décrite dans "Current Protocols in Molecular Biology"; Ausubel et al. Eds. ; publié par Geene Publishing Associates and Wiley Interscience (paragraphe 3.1.6.).

Les conditions choisies sont les suivantes :

10

Coupure par EcoRV

10 µg d'ADN de Baculovirus sont dilués dans 100 µl de tampon Tris HCl 10 mM (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl

5 3 unités d'enzyme par µg d'ADN sont ajoutées. Des dilutions successives sont réalisées dans le même tampon, et pour chaque dilution, après une incubation de 15 minutes à 37 °C, les produits de restriction sont analysés sur gel d'agarose afin de déterminer la dilution
10 qui ne donne qu'une coupure par molécule d'ADN viral.

La dilution retenue est, pour Eco RV, de 1/27.

Coupure par Eco 47 III

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites pour Eco RV.

15 La dilution retenue est de 1/54.

Les molécules coupées par EcoRV et Eco47III sont pourvues d'extrémités franches, ce qui permet de procéder directement à leur ligation pour obtenir des molécules d'ADN viral circulaire..

20 Les molécules d'ADN viral résultantes sont utilisées, après purification, pour transfecter des cultures de cellules de *Spodoptera frugiperda* (Souche SF9, ATCC n° CRL 1711), selon le protocole décrit par GRAHAM et VAN DER ERB, [Virology, 52, 305 - 309 (1973)].

25 Dans ces conditions, les molécules d'ADN portant la délétion souhaitée sont infectieuses, et donnent des virus qui produisent des plages ne formant pas de polyèdres.

Ces virus sont appelés virus pob⁻.

30 **EXEMPLE 2**

L'ADN génomique du baculovirus *Autographa Californica* est digéré successivement par les enzymes KpnI et EcoRV, dans les conditions décrites à l'exemple I, à ceci près que le traitement par Kpn I est
35 effectué dans un tampon sans NaCl, et à une dilution de 1/9. Les molécules sont ensuite reliées et utilisées

pour transfecter des cultures de *Spodoptera Frugiperda*, comme décrit précédemment.

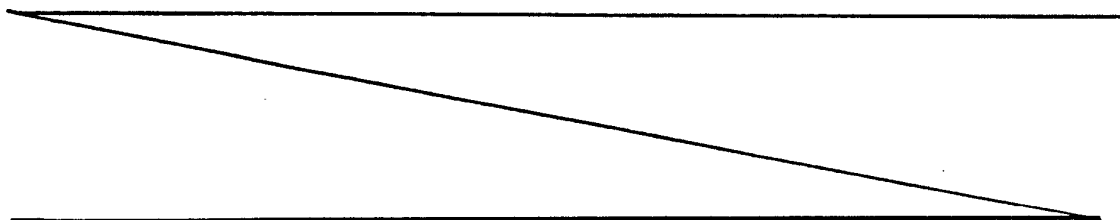
EXEMPLE 3

On procède comme décrit dans les exemples 1 ou 2, à ceci près que le baculovirus sauvage utilisé appartient à la souche *Galleria mellonella*.

EXEMPLE 4 : Insertion de la séquence codant pour la β -galactosidase sous contrôle du promoteur de la protéine P10

Le fragment de restriction Eco R1-P, obtenu à partir du génome du baculovirus *Autographa Californica* sauvage, et qui contient le gène de structure de la protéine P10, est inséré dans le lieu multisite du plasmide pUC9 au site Eco R1. Ce fragment contient un site unique BglII, situé à +152 pb par rapport au codon ATG du gène P10. Un fragment BamHI comprenant la majeure partie du gène de la β -galactosidase, (qui possède un site BamHI en aval de son propre ATG) est inséré au site BglII ; les cadres de lecture du début de la protéine P10 et de la β -galactosidase sont ainsi en phase.

Le plasmide obtenu (D3PZ) possède donc le début du gène de la protéine P10, et le gène de la β -galactosidase. On cotransfecte des cellules de *Spodoptera frugiperda* avec le plasmide D3PZ et l'ADN du virus pob⁻ (1 μ g de D3PZ ; 0,5 μ g d'ADN de pob⁻ ; le protocole est identique à celui de l'exemple 1) et on sélectionne les baculovirus recombinants (pob⁻ β -galactosidase), qui forment des plages bleues en présence de X gal. Les virus recombinants obtenus expriment la β -galactosidase en quantité très importante, comme le montre l'exemple 7 ci-dessous.



EXEMPLE 5 : Introduction du gène de structure de la polyédrine à la place du gène de structure de la protéine P10

Le fragment Eco R1-I de l'ADN génomique du
5 baculovirus d'*Autographa californica*, contenant le gène de la polyédrine a été cloné dans le lieu multisite du plasmide pUC18 au site EcoRI. Un site PvuII a été introduit, à -2 bases par rapport au codon ATG de la séquence codant pour la polyédrine.

10 D'autre part, un plasmide de contenant le fragment Eco R1-P du génome du baculovirus d'*Autographa californica* (cf. exemple 4) est ouvert au site BglII. Après action de l'enzyme Bal31, puis de la polymérase de Klénow un linker BglII est introduit. On obtient ainsi un
15 plasmide appelé pGH 80-82, dépourvu de la majeure partie de la séquence codant pour la protéine P10, et portant un site BglII en position -4 par rapport à l'ATG de la protéine P10.

Le gène de structure de la polyédrine, excisé
20 du plasmide pUC18 à l'aide des enzymes de restriction PvuII et Eco47III, est introduit au site BglII du plasmide pGH 80-82, après restauration des extrémités franches par la polymérase de Klénow.

Le plasmide obtenu, appelé pGH 80-82 ob⁺ est
25 utilisé, avec le virus pob⁻ obtenu à l'Exemple 1, pour cotransfecter des cellules de *Spodoptera frugiperda*.

Les virus recombinants (pob⁻ ob⁺), qui forment des polyèdres, sont sélectionnés.

Une souche de virus recombinants (pob⁻ob⁺) a
30 été déposée le 17 Juillet 1990, auprès de la Collection Nationale de Microorganismes, sous le numéro I-978.

EXEMPLE 6 : Clonage du gène de l'Acétylcholinestérase (Ache) de Drosophile

Un fragment d'ADNc obtenu à partir de l'ARNm
35 de l'Ache a été cloné au préalable dans un plasmide pEMBL8 entre les sites Sma I et Eco R1. A partir dudit

plasmide, le gène de l'Ache est excisé par l'action des enzymes FspI (site à -14 pb du codon ATG de l'Ache) et SacI (site à + 117 pb du codon de terminaison de l'Ache).

Après traitement par l'ADN polymérase du
5 phage T₄, le fragment obtenu est inséré dans le plasmide pGH 80-22, au site Bgl II, dont les extrémités ont été au préalable rendues franches par la polymérase de Klenow. Le plasmide obtenu est appelé pGH 80-22 Ache.

Ce plasmide est utilisé

10 - ou bien pour cotransfecter des cellules avec l'ADN d'un virus pob⁻ ob⁺ ; on sélectionne alors les recombinants qui ne forment plus de polyèdres

- ou bien pour cotransfecter des cellules avec l'ADN d'un virus pob⁻ β-galactosidase : dans ce cas, les
15 virus recombinants sélectionnés seront ceux qui forment des plages blanches.

EXEMPLE 7 : Expression du gène de la β-galactosidase : Comparaison entre des baculovirus recombinants connus dans l'art antérieur et les vecteurs d'expression conformes à l'Invention.
20

Trois constructions ont été réalisées :

- le gène de la β-galactosidase est "fusionné" à celui de la polyédrine (Polyédrine-β-Gal.). Le virus recombinant est de type classique (il possède les deux
25 promoteurs forts) ;

- le gène de la β-galactosidase est fusionné à celui du polypeptide P10 (Acp10Z). Le virus recombinant, est de type classique (il possède les deux promoteurs forts et fabrique des polyèdres) ;

30 - le gène de la β-galactosidase a été fusionné à celui du polypeptide P10 (D3PZ). Le virus recombinant, de type pob⁻, ne possède plus le promoteur ni le gène de la polyédrine.

Ces différents virus recombinants ont été utilisés pour
35 transfecter des cellules de *Spodoptera frugiperda*.

Aux temps suivants : 24h, 48h, 72h après infection

14

l'activité β -galactosidase est mesurée dans le surnageant de culture et dans les cellules elles-mêmes en utilisant l'ONPG comme substrat chromogène. 3 mesures sont faites sur chaque point.

5 Les résultats sont résumés dans le Tableau I suivant :

TABLEAU I.

| | 24 h | | 48 H | | 72 h | |
|-------------------------------|------|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | Sn | Cel | Sn | Cel | Sn | Cel |
| 10 Polyédrine β -Gal | 0 | 225 ± 15 | 770 ± 25 | 17133 ± 1400 | 2735 ± 600 | 36732 ± 1133 |
| Ac P10Z | 0 | 275 ± 10 | 235 ± 20 | 19066 ± 600 | 1105 ± 210 | 42999 ± 4135 |
| 15 D3PZ | 0 | 300 ± 15 | 295 ± 70 | 24733 ± 640 | 2080 ± 1200 | 46532 ± 2400 |

(Unité β -Gal = 1000 (DO₄₂₀)/temps (min) x volume (ml))

Cel = Cellules

Sn = Surnageant

48 heures après transfection, le surnageant de culture renferme très peu d'activité (il n'y a pas encore de lyse cellulaire). Les cellules D3PZ renferment 1,4 fois plus d'activité que les cellules Polyédrine β -Gal. A 72 heures malgré une lyse cellulaire qui devient importante, D3PZ possède toujours plus d'activité que les autres constructions.

EXEMPLE 8 - Construction d'un baculovirus modifié dépourvu du promoteur et du gène de structure de la protéine P10

L'ADN génomique total d'un baculovirus appartenant à la souche *Autographa californica* est coupé successivement par les enzymes XhoI et BglII, suivant la technique de digestion partielle indiquée à l'exemple 1. Les conditions mises en oeuvre sont les suivantes :

Coupure par XhoI

10 µg d'ADN de Baculovirus sont dilués dans 100 µl de tampon Tris HCl 50 mM (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl.

5 3 unités d'enzyme par µg d'ADN sont ajoutées. Des dilutions successives sont réalisées dans le même tampon, et pour chaque dilution, après une incubation de 15 minutes à 37 °C, les produits de restriction sont analysés sur gel d'agarose afin de déterminer la dilution
10 qui ne donne qu'une coupure par molécule d'ADN viral.

La dilution retenue est, pour XhoI, de 1/27.

Coupure par BglII

10 µg d'ADN de Baculovirus sont dilués dans 100 µl de tampon Tris HCl 10 mM (pH 7,5), 10 mM MgCl, 15 50 mM NaCl.

Les autres conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites pour XhoI.

La dilution retenue est de 1/54.

20 Les extrémités des molécules coupées par XhoI et BglII sont réparées par l'enzyme de Klenow avant de procéder à leur ligation.

Les molécules d'ADN viral résultantes sont utilisées pour transfecter des cultures de cellules de *Spodoptera frugiperda*.

25 Dans ces conditions, les molécules d'ADN portant la délétion souhaitée sont infectieuses.

Ces virus sont appelés virus P10⁻ ; ils produisent plus de polyédrine que le virus sauvage.

30 **EXEMPLE 9 - Insertion du gène de la β-galactosidase dans un baculovirus modifié conforme à l'Invention**

Un vecteur de transfert obtenu à partir d'un plasmide pUC8, et comprenant le fragment EcoRI-I du baculovirus (Cf. Exemple 5), qui contient un site unique Bam HI, à +171 bases du codon ATG du gène de la polyédrine, est utilisé pour cette construction.
35

Un fragment Bam HI du gène de la

β -galactosidase (Cf. Exemple 4) est inséré au site Bam HI dudit vecteur de transfert.

Les vecteurs ainsi obtenus sont utilisés, en même temps que des baculovirus modifiés P10⁻, obtenus par
5 le protocole décrit dans l'exemple 8, pour cotransfecter les cellules de *Spodoptera frugiperda*.

Les baculovirus ayant intégré le gène de la β -galactosidase ne forment plus de polyèdres, mais synthétisent la β -galactosidase, facilement détectable et
10 quantifiable par coloration spécifique avec le substrat chromogène X-gal.

La production de β -galactosidase par les baculovirus modifiés ainsi obtenus a été comparée, comme décrit à l'exemple 7, avec celle d'une construction
15 similaire obtenue à partir de baculovirus "sauvages" (possédant le promoteur de la protéine P10 et celui de la polyédrine). Le taux de β -galactosidase produit 48 heures après infection, est de 25% plus élevé chez les baculovirus modifiés dépourvus du promoteur de la
20 protéine P10 que chez les baculovirus sauvages.

MICRO-ORGANISMES

Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page 7, ligne 17-21 de la description 1

A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire : ☐

Nom de l'institution de dépôt :

COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES
DE L'INSTITUT PASTEUR

Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :

28, Rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15 (FRANCE)

Date du dépôt : 17 JUILLET 1990

N° d'ordre : I-978

B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES : (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements ☐

En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de la délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant (règle 28.4 de la CBE).

C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES : (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)BREVET EUROPEEN - AUSTRALIE - BULGARIE - CANADA - FINLANDE -
HONGRIE - JAPON - NORVEGE - POLOGNE - UNION SOVIETIQUE -
ETATS-UNIS D'AMERIQUE - TCHECOSLOVAQUIE.**D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT :** (à ne remplir que si nécessaire)

Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., «No d'ordre du dépôt»)

E. ☐ La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)

(Fonctionnaire autorisé)

☐ Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international

(Fonctionnaire autorisé)

REVENDICATIONS

- 1) Vecteurs d'expression, caractérisés en ce qu'il sont obtenus à partir d'un baculovirus modifié dans lequel un des deux promoteurs tardifs forts présents dans le génome du baculovirus sauvage est inactif, et en ce que la séquence placée sous le contrôle du promoteur tardif fort actif dans ledit baculovirus modifié est différente de la séquence correspondante du baculovirus sauvage.
- 2) Vecteur d'expression selon la Revendication 1, caractérisé en ce que le promoteur inactif est celui du gène de la polyédrine et le promoteur actif est celui du gène de la protéine P10.
- 3) Vecteur d'expression selon la Revendication 1, caractérisé en ce que le promoteur inactif est celui du gène de la protéine P10, et le promoteur actif est celui du gène de la polyédrine.
- 4') Baculovirus modifié, utilisable pour l'obtention d'un vecteur d'expression, selon la revendication 2, caractérisé en ce que son génome est dépourvu d'une séquence d'ADN comprise entre le site EcoRV situé à -95 pb et le site SspI situé à +910 pb du codon d'initiation ATG de la séquence de la polyédrine.
- 5') Baculovirus modifié, utilisable pour l'obtention d'un vecteur d'expression, selon la revendication 2, caractérisé en ce que son génome est dépourvu d'une séquence d'ADN comprise entre le site EcoRV situé à -95 pb et le site KpnI situé à +633 pb du codon d'initiation ATG de la séquence de la polyédrine.
- 6') Baculovirus modifié, utilisable pour l'obtention d'un vecteur d'expression, selon la revendication 2, caractérisé en ce que son génome est dépourvu d'une séquence d'ADN comprise entre le site EcoRV situé à -95 pb et le site Eco47III situé à +733 pb du codon d'initiation ATG de la séquence codant pour la polyédrine.

7') Baculovirus modifié utilisable pour l'obtention de vecteurs d'expression selon la Revendication 3, caractérisé en ce que son génome est dépourvu du promoteur du gène de la protéine P10.

5 8') Baculovirus modifié selon la revendication 7, caractérisé en ce que son génome est dépourvu d'une séquence d'ADN comprise entre le site XhoI situé à +569pb du codon d'initiation ATG de la séquence codant pour le polypeptide P26 et le site BglII, situé à +152pb du codon
10 d'initiation ATG de la séquence codant pour le polypeptide P10.

9') Vecteur d'expression, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il contient une séquence marqueur, placée sous le contrôle
15 du promoteur actif.

10') Vecteur d'expression, selon la revendication 9, caractérisé en ce que la séquence marqueur est la séquence codant pour la polyédrine, laquelle séquence est placée sous le contrôle du promoteur du gène de la protéine P10.
20

11') Souche de baculovirus modifié, constituant un vecteur d'expression, selon la Revendication 10, laquelle souche a été déposée en date du 17 Juillet 1990 auprès de la Collection Nationale de
25 Microorganismes, sous le numéro de dépôt I-978.

12') Vecteur d'expression, selon la revendication 9, caractérisé en ce que la séquence marqueur est la séquence codant pour la β -galactosidase.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 91/00588

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.C1.5 C 12 N 15/86 C 12 N 15/33 C 12 N 15/52
C 12 N 7/01 //(C 12 N 7/01 C 12 R 1:92)

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System |

Classification Symbols

Int.C1.5 C 12 N 15/86 C 12 N 15/33 C 07 K 15/00

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *

| Category * | Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² | Relevant to Claim No. ¹³ |
|------------|--|-------------------------------------|
| Y | Gene, volume 70, No 1, 15 October 1988, Elsevier Science Publishers B.V. (Amsterdam, NL) C. Rankin et al.: "Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression", pages 39-49, see the whole document (cited in the application) --- | 1-3,9-10,12 |
| Y | Journal of General Virology, volume 71, No 7, July 1990, (Colchester, GB) U. Weyer et al.: "Analysis of very late gene expression by Autographa californica nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vectors", pages 1525-1534, see the whole article --- | 1-3,9-10,12 |
| | -/- | |

* Special categories of cited documents: ¹⁰

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

11 October 1991 (11.10.91)

Date of Mailing of this International Search Report

11 December 1991 (11.12.91)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) | | |
|--|--|----------------------|
| Category * | Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to Claim No |
| A | Journal of General Virology, volume 69, No 4, April 1988 (Colchester, GB) J.M. Vlak et al.: "Functional studies on the p10 gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-beta-galactosidase fusion gene", pages 765-776, see the whole article --- | 1-2,9, 12 |
| Y | Gene, volume 75, No 1, 30 January 1989, Elsevier Science Publishers B.V. (Amsterdam, NL) K. Iatrou et al.: "Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus-based vectors for expressing passenger genes in silkworm cells under viral or cellular promoter control", pages 59-71, see the whole document (cited in the application) --- | 1-3,9 |
| Y | Biological Abstracts Database, abstract No 88037377, J. Qin et al.: "Studies on the control region of the P10 gene of the Autographa-californica nuclear polyhedrosis virus", & J. Gen. Virology, 1989, vol. 70, No 5 pages 1273-1280, see abstract (cited in the application) --- | 1-3,9 |
| A | EP,A,0127839 (THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM) 12 December 1984, see the whole document (cited in the application) --- | 1,9 |
| A | Biotechnology Abstracts Database, abstract No 88-01644, R.D. Possee et al.: "Analysis of the polyhedrin gene promoter of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. Potential baculo virus vector for foreign gene expression", & Nucleic Acids Res. 1987, vol. 15, No 24, pages 10233-48, see the abstract ----- | 1 |

SA 49800

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 91/00588

| | | |
|--|--|--|
| I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷ | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Int.C1.5 C 12 N 15/86 C 12 N 15/33 C 12 N 15/52 C 12 N 7/01 //(C 12 N 7/01 C 12 R 1:92) | | |
| II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE | | |
| Documentation minimale consultée ⁸ | | |
| Système de classification | Symboles de classification | |
| Int.C1.5 | C 12 N 15/86 C 12 N 15/33 C 07 K 15/00 | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹ | | |
| | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰ | | |
| Catégorie ° | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³ | No. des revendications visées ¹⁴ |
| Y | Gene, volume 70, no. 1, 15 octobre 1988, Elsevier Science Publishers B.V. (Amsterdam, NL) C. Rankin et al.: "Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression", pages 39-49, voir le document en entier (cité dans la demande) --- | 1-3,9-10,12 |
| Y | Journal of General Virology, volume 71, no. 7, juillet 1990, (Colchester, GB) U. Weyer et al.: "Analysis of very late gene expression by Autographa californica nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vectors", pages 1525-1534, voir l'article en entier --- <div style="text-align: center;">-/-</div> | 1-3,9-10,12 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>° Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> | | |
| IV. CERTIFICATION | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale |
| 11-10-1991 | | 11. 12. 91 |
| Administration chargée de la recherche internationale | | Signature du fonctionnaire autorisé |
| OFFICE EUROPEEN DES BREVETS | | N. DE BIE |

| III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴ | | (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE) |
|--|---|---|
| Catégorie ^o | Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷ | No. des revendications visées ¹⁸ |
| A | Journal of General Virology, volume 69, no. 4, avril 1988 (Colchester, GB) J.M. Vlak et al.: "Functional studies on the p10 gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-beta-galactosidase fusion gene", pages 765-776, voir l'article en entier --- | 1-2,9, 12 |
| Y | Gene, volume 75, no. 1, 30 janvier 1989, Elsevier Science Publishers B.V. (Amsterdam, NL) K. Iatrou et al.: "Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus-based vectors for expressing passenger genes in silkworm cells under viral or cellular promoter control", pages 59-71, voir l'article en entier (cité dans la demande) --- | 1-3,9 |
| Y | Biological Abstracts Database, abrégé no. 88037377, J. Qin et al.: "Studies on the control region of the P10 gene of the Autographa-californica nuclear polyhedrosis virus", & J. Gen. Virology, 1989, vol. 70, no. 5, p. 1273-1280, voir l'abrégé (cité dans la demande) --- | 1-3,9 |
| A | EP,A,0127839 (THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM) 12 décembre 1984, voir le document en entier (cité dans la demande) --- | 1,9 |
| A | Biotechnology Abstracts Database, abrégé no. 88-01644, R.D. Possee et al.: "Analysis of the polyhedrin gene promoter of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. Potential baculo virus vector for foreign gene expression", & Nucleic Acids Res. 1987, vol. 15, no. 24, p. 10233-48, voir l'abrégé ----- | 1 |

FR 9100588
SA 49800

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 10/12/91
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| EP-A- 0127839 | 12-12-84 | US-A- 4745051 | 17-05-88 |
| | | AU-B- 581174 | 16-02-89 |
| | | AU-A- 2871784 | 29-11-84 |
| | | CA-A- 1222213 | 26-05-87 |
| | | JP-A- 60037988 | 27-02-85 |
| | | US-A- 4879236 | 07-11-89 |
| ----- | | | |